

ФИЗИОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ NO-СИНТАЗ НА ПРОДУКЦИЮ ОКСИДА АЗОТА В СЕРДЦЕ КРЫС ПРИ ГИПОКИНЕЗИИ

Р.И. Зарипова¹, Х.Л. Гайнутдинов², Т.Л. Зефилов¹

¹ Кафедра анатомии, физиологии и охраны здоровья человека (зав. – проф. Т.Л. Зефилов) ФГАОУВПО Казанского (Приволжский) федерального университета, Казань; ² ФГБУН Казанский физико-технический институт КазНЦ РАН (директор – академик РАН К.М.Салихов), Казань.

Экспериментально, методом ЭПР спектроскопии, найдено увеличение интенсивности продукции оксида азота (NO) в сердце крыс при моделировании 90-суточной гипокинезии. Применение неселективного блокатора NO-синтаз L-NAME у гипокинезированных крыс приводило к снижению содержания NO в тканях предсердий и желудочков сердца на 67-70%. Введение селективного блокатора индуцибельной NO-синтазы аминогуанидина также вызывало снижение содержания NO в тканях предсердий и желудочков на 60-65%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение продукции NO при гипокинезии происходит за счет активации NO-синтаз.

Ключевые слова: оксид азота, сердце, крыса, гипокинезия, электронный парамагнитный резонанс.

Influence of NO synthase inhibitors on the nitric oxide productions in rat heart during hypokinesia

Zaripova R.I., Gainutdinov Kh.L., Zefirov T.L.

Experimentally, by EPR spectroscopy method, was found an increase in the intensity of production of nitric oxide (NO) in the rats hearts after 90-days hypokinesia. Of nonselective blockade of NO-synthase activity by L-NAME to hypokinezed rats resulted in a decrease of content of NO in atrias and ventricles of the heart by 67-70%. Selective blockade of inducible NO-synthase by aminoguanidine caused a decrease of the content of NO in the tissues of the atrias and ventricles by 60-65%. The obtained results suggest that increasing of NO production under hypokinesia occurs through the activation of NO-synthase activity.

Key words: nitric oxide, heart, rat, hypokinesia, electron paramagnetic resonance.

Адрес для корреспонденции: ratno1992@mail.ru. Зарипова Р.И.

В основе регуляции работы сердца лежат симпато-парасимпатические взаимодействия [3]. В настоящее время существенное значение в реализации регуляторных влияний играет оксид азота (NO). В организме существует два основных пути образования NO: ферментативный и неферментативный. Ферментативный синтез NO в клетках осуществляется семейством белков с общим названием «NO-синтаза» (NOS), которые традиционно подразделяются на конститутивную (cNOS) и индуцибельную (iNOS) [8; 13]. Оксид азота, синтезируемый cNOS, обеспечивает адекватное кровоснабжение, влияет на активность нейронов, регулирует метаболизм клеток [9; 14; 10]. Под влиянием иммуногенных и провоспалительных стимулов происходит экспрессия гена, ответственного за синтез iNOS [11; 13]. Под неферментативным путем понимают восстановление нитритов или нитратов до NO (нитритредуктазный механизм) [7].

В связи с увеличением продолжительности жизни, значительным уменьшением физической активности, особенно у детей и лиц, не занимающихся физическим трудом, большую актуальность приобрела проблема изменений физиологических функций и механизмов их развития в условиях гипокинезии. Исходя из этого, целью исследования явилось изучение влияния блокаторов NOS на содержания NO в тканях органов гипокинезированных крыс.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены на белых лабораторных беспородных крысах, которых разделили на 3 группы: I – контрольная группа, которая содержалась в стандартных условиях вивария; II – опытная группа, которая содержалась в условиях 90-суточной гипокинезии; III – опытная группа (гипокинезия), которой предварительно вводились блокаторы NOS. Гипокинезию (ГК) начинали с 21-дневного возраста: первые два дня время ГК составляло 1 час, а в дальнейшем увеличилось на 2 часа через каждые 2 дня. К 25 дню ГК время пребывания животных в клетках-пеналах достигло 23 часов и в дальнейшем оставалась постоянным. При 22-23 часовой ГК животных выпускали из пеналов-клеток на 1-2 часа [1].

Изучали содержание NO в тканях желудочков и предсердий сердца, печени. Содержание NO в органах крыс определялось методикой, разработанной в институте химической физики РАН профессором А.Ф. Ваниным и сотрудниками, в которой используется метод спинового захвата. Подробности эксперимента и методики описаны нами ранее [2]. Регистрация спектров ЭПР приготовленных образцов проводилась на спектрометре ЭПР X-диапазона EMX/plus фирмы "Bruker" с температурной приставкой ER 4131VT при 140 K° и следующих условиях: частота модуляции 100 kHz, амплитуда модуляции 5 Гс, мощность СВЧ излучения 2 mW, временная константа 81 ms, частота СВЧ

излучения 9,445367 МГц.

В качестве наркоза использовали 25% раствор уретана из расчета 1200 мг/кг массы животного, который вводился внутривентрально. В качестве неселективного блокатора NO-синтазы в работе применялся L-NAME в дозе 10 мг/кг. L-NAME вводили внутривентрально, предварительно за 60 мин до декапитирования. Для селективной блокады индуцибельной NO-синтазы использовался амингуанидин (AG) в концентрации 10 мг/кг, который также вводился внутривентрально, предварительно за 60 мин до декапитирования. Все препараты, используемые нами, разводились в физиологическом растворе. Дозы выбраны аналогичные тем, которые используются другими исследователями [12; 15].

Результаты были статистически обработаны. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента и U- критерию Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рисунке 1 приведены образцы спектров ЭПР тканей сердца крыс различных серий экспериментов. В соответствии с рисунком 2, количество NO-содержащего парамагнитного комплекса $(\text{DЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ в тканях сердца и печени после пребывания в условиях 90-суточной гипокинезии составило $104,8 \pm 6,6$ отн.ед и $225,0 \pm 9,4$ отн.ед., соответственно. Содержание данного комплекса в сердце и печени крыс, которым предварительно был введен блокатор NO-синтазы L-NAME, составило $33,2 \pm 2,6$ отн.ед и $39,2 \pm 5,5$ отн.ед.. Таким образом, применение неселективного блокатора NO-синтазы L-NAME приводило к снижению содержания NO в тканях сердца и печени крыс на 68,3% и 82,6%, соответственно. Применение блокатора подавляет эффект активации синтеза NO в условиях ограничения двигательной активности до уровня, значительно ниже значения у контрольных животных. Основываясь на выполненных экспериментах, нами было установлено, что увеличение образования NO при гипокинезии происходит за счет интенсификации ферментативного пути синтеза NO, а доля NO, образованного по нитритредуктазному механизму, в условиях гипокинезии не увеличивается. Поэтому в следующей серии экспериментов была поставлена задача определения типа NO-синтазы, которая являлась источником повышения продукции NO при ГК. Для решения этих задач был использован селективный блокатор iNOS - амингуанидин.

В соответствии с рисунком 3, применение селективного блокатора iNOS амингуанидина при гипокинезии приводило к снижению содержания NO в тканях предсердий и желудочков сердца крыс на 64,5% и 57,3% соответственно. В тканях печени применение амингуанидина приводило к снижению содержания NO на 71,2%. Это

позволяет утверждать, что за активацию синтеза NO при гипокинезии преимущественна ответственна iNOS.

Гипокинезия приводит к ослаблению сердечной мышцы, снижению энергетического потенциала сердца, сокращению его минутного объема, а также ослаблению как венозных, так и артериальных сосудов, т. е. появляются признаки фазового синдрома гиподинамии сердца. Все эти явления неминуемо ведут к гипоксии, сопровождающейся усилением синтеза оксида азота и ионов NO^{3-} и NO^{2-} [4; 5]. В наших опытах не исключено влияние на организм иммобилизационного стресса. Существует гипотеза о том, что стресс-реакция и долговременная адаптация приводят (или являются следствием) к уменьшению либо увеличению продукции NO [6]. Также было обнаружено, что при 30-суточной гипокинезии происходит увеличение синтеза и секреции провоспалительных (Ил-1, Ил-6 и ФНО) и противовоспалительных (Ил-4, Ил-10, Ил-12) цитокинов [4]. Известно, что Ил-1, ФНО α и Ил-6 активируют индуцибельную NO-синтазу. Значительное увеличение продукции NO, полученное в наших экспериментах, может свидетельствовать о таком механизме.

Имеющиеся результаты помогут понять роль оксида азота в механизмах формирования и протекания различных заболеваний. Перспективность исследований проблемы NO при стрессе и адаптации связана с тем, что многие шоковые состояния в организме сопровождаются гиперпродукцией оксида азота, а патологические состояния, в развитии которых стресс играет важную роль – снижением мощности генерации NO.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 13-04-97082 р).

Р.И. Зарипова, Х.Л. Гайнутдинов, Т.Л. Зефирова

Адрес для переписки:

420021, г. Казань, Лево-Булачная, 44

Казанский (Приволжский) федеральный университет

Зарипова Раиля Ирековна

раб. тел. (8-843)292-92-66; E-mail: ratno1992@mail.ru

ЛИТЕРАТУРА

1. Абзалов Р.А. Насосная функция сердца развивающегося организма и двигательный режим / Р.А. Абзалов. – Казань: КГПУ, 2005. – 277с.
2. Гайнутдинов Х.Л. Исследование методом ЭПР спектроскопии интенсивности продукции оксида азота в организме крыс при гипокинезии / Х.Л. Гайнутдинов, В.В. Андрианов, В.С. Июдин, С.В. Юртаева, Г.Г. Яфарова, Р.И. Файзуллина, Ф.Г. Ситдинов // БИОФИЗИКА. - 2013, т.58, вып. 2, С. 276-280.
3. Зефирова Т.Л. Возрастные особенности инотропной реакции миокарда крыс на селективную блокаду m1-холинорецепторов. / Т.Л. Зефирова, Н.И. Зиятдинова, А.Л. Зефирова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013, т. 58, № 6. – С. 667-669.
4. Камскова Ю.Г. Изменение антиоксидантного статуса и уровня ПОЛ в крови и печени в динамике 30-ти суточной гипокинезии / Камскова Ю. Г. // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2001, – №10. – С.387-389.
5. Куроптева З.В. Влияние гипоксии на образование оксида азота в тканях сердца животных / З.В. Куроптева, В.П. Реутов, Л.М. Байдер, О.Л. Белая, А.Л. Крушинский, В.С. Кузенков, Ж.Т. Молдалиев // Доклады академии наук. – 2011. – Т. 441, № 3. – С. 406-409.
6. Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресс-лимитирующая система оксида азота // Рос. физиолог, ж. им. И.М. Сеченова. – 2000. – № 10. – С. 1283 – 1292.
7. Осипов А.Н. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов / А.Н. Осипов, Г.Г. Борисенко, Ю.А. Владимиров // Успехи биол. хим. – 2007. – Т. 47. – С. 259-292.
8. Реутов В.П. Оксид азота и цикл в миокарде: молекулярные, биохимические и физиологические аспекты / В.П. Реутов, В.Е. Охотин, А.В. Шуклин, Е.Г. Сорокина, Н.С. Косицын, В.Н. Гурин // Успехи физиол. наук. – 2007. – Т.38, №4. – С. 39-58.
9. Alderton W.K. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition / W.K. Alderton, С.Е. Cooper, R.G. Knowles // Biochem J. – 2001. – Aug 1, 357(Pt 3). – P. 593-615.
10. Calabrese V. Nitric oxide in cell survival: a janus molecule / V. Calabrese, C. Cornelius, E. Rizzarelli, J.B. Owen, A.T. Dinkova-Kostova, D.A. Butterfield // Antioxidants and Redox Signaling. – 2009. – V. 11, N 11. – P. 2717-2739.
11. Daff S. NO synthase: structures and mechanisms / S. Daff // Nitric Oxide. – 2010. – V. 23, N 1. – P. 1-11.
12. Davis B.J. Activation of the AMP-Activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. Diabetes / B. J. Davis, Z. Xie, B. Viollet et al. // – 2006. – Feb; V. 55(2) – P. 496 – 505.

13. Forstermann U. Nitric oxide synthases: regulation and function / U. Forstermann, W.C. Sessa // European Heart Journal. – 2012. – V. 33. – P. 829-837.

14. Sangwon F. Inducible Nitric Oxide Synthase Binds, S-Nitrosylates, and Activates Cyclooxygenase-2 / F. Kim Sangwon, A. Huri Daniel, H. Snyder Solomon // Science. – 2005. – V. 310. – P. 1966-1970.

15. Vitecek J. Arginine-Based Inhibitors of Nitric Oxide Synthase: Therapeutic Potential and Challenges / J. Vitecek, A. Lojek, G. Valacchi, L. Kubala // Mediators of Inflammation. – 2012. – V. 2012. – 22 p.

Рисунок 1. Спектры ЭПР тканей сердца крыс. Рамкой обведена часть сигнала от комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$. Ось абсцисс – величина магнитного поля.

Рисунок 2. Эффект неселективной блокады NOS блокатором L-NAME на продукцию NO в тканях сердца и печени крыс. Ось ординат – интегральная интенсивность сигнала от комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$. Примечание: * - достоверность по сравнению с I экспериментальной группой: $p < 0,05$; # - достоверность по сравнению со II экспериментальной группой: $p < 0,05$.

Рисунок 3. Эффект блокады iNOS блокатором аминугуанидином на продукцию NO в тканях печени, предсердий и желудочков сердца крыс. Ось ординат – интегральная интенсивность сигнала от комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$. Примечание: * - достоверность по сравнению с I экспериментальной группой: $p < 0,05$; # - достоверность по сравнению со II экспериментальной группой: $p < 0,05$.

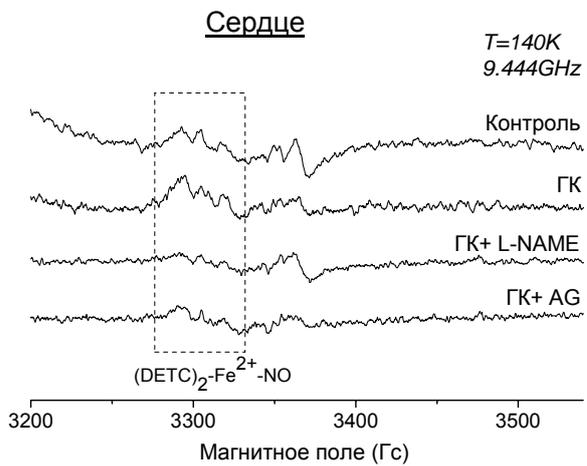


Рисунок 1.

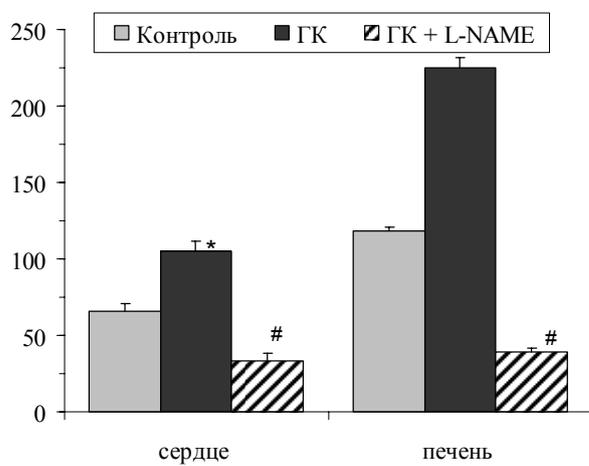


Рисунок 2.

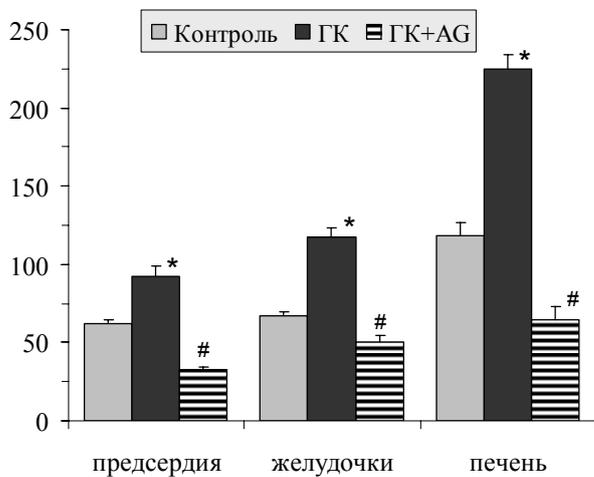


Рисунок 3.